

**VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES STERILEN KOLLAGENPRODUKTES MIT
FILZ- BZW. VLIESARTIGER FASERSTRUKTUR****Publication number:** DE2625289**Publication date:** 1976-12-09**Inventor:** RIES PETER E DR**Applicant:** PENTAPHARM AG**Classification:****- international:** **A61L15/32; A61L15/40; A61L26/00; A61L15/16;
A61L26/00; (IPC1-7): A61L15/01; A61K37/12****- European:** A61L15/32A; A61L15/40; A61L26/00B6A**Application number:** DE19762625289 19760604**Priority number(s):** CH19750007372 19750605**Also published as:**

CH627078 (A5)

Report a data error here**Abstract of DE2625289**

The collagen product is prepared from collagen-containing tissue from slaughtered animals, and in the process the collagen-containing tissue is, at temperatures not exceeding 40 DEG C, finely comminuted and subsequently fat and unwanted water-soluble ballast materials are simultaneously removed by extracting the tissue suspension several times with 5 times the volume of 5-15 % strength aqueous NaCl solution which contains 0.1-1 % sodium azide as preservative and a fat-dispersing wetting agent, and treating the resulting tissue with a proteolytic enzyme which does not attack the basic structure of the collagen but breaks down non-collagenous proteinaceous concomitant substances and telopeptides.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

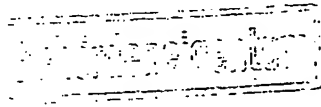
⑤1

Int. Cl. 2:

A 61 L 15/01

A 61 K 37/12

①9 **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**



DT 26 25 289 A 1

①1

Offenlegungsschrift 26 25 289

②1

Aktenzeichen: P 26 25 289.1

②2

Anmeldetag: 4. 6. 76

④3

Offenlegungstag: 9. 12. 76

③0

Unionspriorität:

③2 ③3 ③1

5. 6. 75 Schweiz 7372-75

⑤4

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung eines sterilen Kollagenproduktes mit filz- bzw. vliesartiger Faserstruktur

⑦1

Anmelder: Pentapharm AG, Basel (Schweiz)

⑦4

Vertreter: Wirth, P., Dipl.-Ing.; Dannenberg, G.E.M., Dipl.-Ing.;
Schmied-Kowarzik, V., Dr.; Weinhold, P., Dr.; Gudel, D., Dr.;
Pat.-Anwälte, 6000 Frankfurt

⑦2

Erfinder: Ries, Peter E., Dr., Reinach (Schweiz)

⑤6

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DT-OS 24 62 222

DT-OS 23 48 685

OE 3 24 578

26 25 289 A 1

2625289

PATENTANWÄLTE

Dipl.-Ing. P. WIRTH · Dr. V. SCHMIED-KOWARZIK

Dipl.-Ing. G. DANNENBERG · Dr. P. WEINHOLD · Dr. D. GUDEL

TELEFON (0811) 281134
287014

6 FRANKFURT/M.
GR. ESCHENHEIMER STR. 39

Case: 7372/75

Wd/jn

PENTAPHARM A. G.
Engelgasse 109
Basel / Schweiz

Verfahren zur Herstellung eines sterilen
Kollagenproduktes mit filz- bzw. vliesar-
tiger Faserstruktur

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines sterilen Kollagenproduktes mit filz- bzw. vliesartiger Faserstruktur. Dieses Kollagenprodukt ist in der Medizin als Wundabdeckungs- bzw. Wundverklebungsmaterial und zum Ausfüllen von pathologischen Knochenhöhlräumen verwendbar.

Es ist an sich bekannt, aus tierischen Geweben hergestellte Kollagenprodukte zur Wundabdeckung und Wundverklebung zu verwenden. Im brit. Patent Nr. 1.147.072 ist ein Wundabdeckungsmaterial beschrieben, das aus einem durch Schäumen eines Kollagensols erzeugten Kollagenschwamm und einer mit letzterem verklebten Kollagenfolie zusammengesetzt ist. Im südafrikanischen Patent Nr. 6705.871 ist ein

Kollagenprodukt beschrieben, das aus mikrokristallinem kolloidalem Kollagen besteht und dazu bestimmt ist, als Mischkomponente mit anderen Wirksubstanzen in kosmetischen und pharmazeutischen Präparaten verwendet zu werden. Auf dem Markt ist ferner ein Kollagenpräparat in Form eines leichten flockigen Pulvers erhältlich, das zwar eine hämostatische Wirkung ausübt, aber schwer in die Tiefe einer Wunde einzuführen ist und bei stärkeren diffusen Blutungen weggespült wird.

Um bei der Wundheilung mittels Kollagen optimale Resultate zu erzielen, müsste man über ein Kollagenprodukt verfügen, das gleichzeitig die folgenden Eigenschaften in sich vereinigen sollte:

1. eine hämostatische Wirkung ausüben;
2. gegenüber Körperflüssigkeiten ein gutes Absorptionsvermögen aufweisen;
3. eine die Neubildung von Geweben, insbesondere Knochengewebe, fördernde Wirkung ausüben;
4. eine gute Resorbierbarkeit aufweisen;
5. eine möglichst geringe Antigenwirkung ausüben, und
6. für das Aufbringen auf bzw. Einführen in Wunden oder pathologische Knochenhöhlen optimale mechanische Eigenschaften besitzen.

Die in der Literatur beschriebenen oder im Handel erhältlichen Kollagenprodukte besitzen die eine oder andere dieser Eigenschaften, jedoch nicht alle zusammen.

Es wurde nun gefunden, dass man durch eine neuartige Kombination von chemischen und physikalischen Behandlungen von kollagenhaltigen Geweben von Schlachttieren ein Kollagenprodukt erhalten kann, das eine filz- bzw. vliesartige Struktur aufweist und die oben definierten Forderungen voll erfüllt.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines sterilen Kollagenproduktes mit filz- bzw. vliesartiger Faserstruktur durch Entfettung von kollagenhaltigem Gewebe von Schlachttieren, Extraktion des entfetteten Gewebes mit Elektrolytlösungen zur Entfernung von nicht-kollagenen löslichen Ballaststoffen, Behandlung des erhaltenen Gewebes mit einem proteolytischen, die Grundstruktur des Kollagens nicht angreifenden Enzym zwecks Entfernung von nicht-kollagenen proteinartigen Begleitsubstanzen und Telo-peptiden, Reinigung des erhaltenen Rohkollagens durch Umfällung, Entsalzung des gereinigten Kollagens, Lösen des gereinigten und entsalzten Kollagens in Wasser, Gefriertrocknen des Kollagens und Sterilisation des getrockneten Kollagens.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man das kollagenhaltige Gewebe bei 40°C nicht übersteigenden Temperaturen sehr fein zerkleinert und

die Entfettung und die Entfernung der unerwünschten wasserlöslichen Ballaststoffe gleichzeitig durchführt, indem man den Gewebebrei mit dem 5-fachen Volumen 5-15%iger wässriger NaCl-Lösung, die 0,2-1‰ Natriumazid als Konservierungsmittel und ein fettdispersierendes Netzmittel enthält, mehrmals extrahiert.

Als Ausgangsmaterial zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens kann man z.B. Häute, Sehnen oder Knochen von Schlachttieren, z.B. Schweinen oder Rindern, verwenden.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann im einzelnen wie folgt durchgeführt werden:

Das kollagenhaltige Gewebematerial, z.B. Schweinehaut, wird bei 40°C nicht übersteigenden Temperaturen fein zerkleinert. Vorzugsweise wird das Gewebematerial vor dem Zerkleinern auf -10 bis -20°C abgekühlt. Der Gewebebrei wird dann mit etwa der 5-fachen Volummenge 5-15%iger, vorzugsweise 10%iger wässriger NaCl-Lösung, die 0,1-1‰ Natriumazid als Konservierungsmittel und 0,5-2 Gew.% eines nicht-ionischen fettdispersierenden Netzmittels enthält, extrahiert. Durch diese Extraktion werden dem Gewebe unerwünschte wasserlösliche Ballaststoffe und das Fett entzogen. Als Netzmittel können z.B. die für Haushaltzwecke bestimmten Wasch- und Reinigungsmittel verwendet werden. Das als Konservierungsmittel verwendete Natriumazid hat gegenüber

den bisher verwendeten organischen Konservierungsmitteln den Vorteil, dass es in Wasser leicht löslich und deshalb leicht auswaschbar ist. Diese Extraktion wird mehrmals, z.B. zweimal, wiederholt.

Der so entfettete fasrige Gewebebrei wird zur pH-Umstellung mit Wasser oder mit 0,1- bis 5%iger Ameisen-, Essig- oder Zitronensäure oder einer anderen ähnlich wirkenden organischen aliphatischen Säure, vorzugsweise mit 3%iger Essigsäure gewaschen und anschliessend im 5-fachen Volumen 0,1-5%iger, vorzugsweise 3%iger Essigsäure, der 1 Gew.°/oo, bezogen auf das Gewicht des eingesetzten Gewebematerials, eines proteolytischen Enzyms, vorzugsweise Pepsin, und 1°/oo Chloroform als Konservierungsmittel zugesetzt worden sind, bei pH 2,5-3,5 verdaut. Dabei werden nicht-kollagene proteinartige Begleitsubstanzen und die sogenannten Telopeptide, die weitgehend für die Antigenität des Kollagens verantwortlich sind, abgebaut, ohne dass die eigentlichen Kollagenfadenmoleküle in kleine Peptide aufgespalten werden. Nach 8-48 Stunden Reaktionszeit wird die homogene stark viskose Kollagensuspension durch eine G 1-Glassinternutsche oder durch ein entsprechendes feines rostfreies Drahtsieb filtriert. Aus dem viskosen Filtrat wird das Kollagen durch Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung bis zur Erzielung einer Konzentration von etwa 3-5% NaCl ausgefällt. Zur Inaktivierung des im Reaktionsgemisch verbleibenden Pepsins wird der pH-Wert des erhaltenen Kollagenbreies durch Zugabe von Alkalihydroxydlösungen, vorzugsweise Natronlauge, auf pH 8,6-8,8 eingestellt.

Nach 1/2-1 Stunde wird das erhaltene Rohkollagen zentrifugiert. Das Rohkollagen wird durch Lösen in 0,05-5%iger Lösung einer der zuvor genannten organischen Säuren, vorzugsweise in 3%iger Essigsäure und Fällung mittels NaCl oder KCl gereinigt. Das ausgefällte Kollagen wird durch Zentrifugation abgetrennt. Diese Reinigung wird zweckmässigerweise wiederholt. Das so erhaltene gereinigte Kollagen wird zur Entfernung des von der Fällung herrührenden Salzes so lange mit 60-75, vorzugsweise 70 volumenprozentigem wässrigem Aethylalkohol gewaschen, bis der Salz-Gehalt des Kollagens zwischen 0 und 0,9%, liegt, bezogen auf das Gewicht des Trockenrückstandes des Kollagenbreies. Das entsalzte Reinkollagen wird durch Zentrifugieren oder Abnutschen von überschüssigem Alkohol befreit. Kleine Restmengen von Alkohol beeinträchtigen die weitere Verarbeitung nicht. Die Entsalzung des Kollagens kann auch durch Ultrafiltration oder Dialyse durchgeführt werden.

Das gereinigte und entsalzte Kollagen wird in entmineralisiertem oder destilliertem Wasser, gegebenenfalls unter Zusatz von bis zu 3% Essig- oder Ameisensäure in einer Konzentration gelöst, welche einem Trockenrückstand von 0,5 bis 2 Gew.% entspricht. Das wässrige Kollagen wird dann der Gefriertrocknung unterworfen. Das entwässerte Kollagen kann in Beutel aus Kunststoff-Folien, z.B. Polyäthylen, verpackt werden, die durch Verschweissen verschlossen werden können. Das Kollagenprodukt wird in der Verpackung durch Bestrahlung mit einer Dosis von 2-3,5 Mrad γ -Strahlen sterilisiert.

Je nach der Form des Gefässes, in welchem die Gefrier Trocknung des Kollagens durchgeführt wird, kann das Kollagenprodukt z.B. in Form von Scheiben oder quadratischen bzw. rechteckigen Platten erhalten werden.

Das nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellte Kollagenprodukt weist eine filz- bzw. vliesartige Faserstruktur auf, in welcher die Zwischenräume oder Hohlräume zwischen den Fasern kommunizierend sind, was zur Folge hat, dass das Kollagenmaterial eine grosse Saugfähigkeit für Körperflüssigkeiten besitzt. Das erfindungsgemäss hergestellte Kollagenprodukt ist biegsam und lässt sich leicht in Stücke der gewünschten Grösse und Form schneiden und somit bequem auf Wunden aufbringen, in Wunden einsetzen oder mittels chirurgischen Klebern an Wunden aufkleben. Das Kollagenprodukt weist ausserdem eine hohe hämostatische Aktivität auf und ist sehr leicht resorbierbar. Es besitzt ferner die Eigenschaft, die Neubildung der Gewebe, insbesondere der Knochengewebe, stark zu fördern, was in der chirurgischen Orthopädie von besonderer Wichtigkeit ist. Nach den bisherigen Erfahrungen übt das erfindungsgemäss hergestellte Kollagenprodukt praktisch keine antigene Wirkung aus.

Das vorliegende Kollagenprodukt eignet sich ganz allgemein zur oberflächlichen Wundabdeckung zwecks Beschleunigung der Wundheilung und gewährt Schutz gegen Infektionen und Dehydratation. Es eignet sich ferner als Hämostypticum bei

parenchymatösen Blutungen und als Trägermaterial für chirurgische Kleber zur Gewebeverklebung sowie als Füllmaterial für pathologische Knochenhöhlräume und ersetzt dadurch die Spongiosoplastik in der chirurgischen Orthopädie. Vergleichsweise sind die in der Literatur beschriebenen und im Handel erhältlichen Kollagenprodukte für diesen Zweck völlig unbrauchbar. Die Verwendung des erfindungsgemäss hergestellten Kollagenmaterials ist in folgenden Fällen angezeigt: Behandlung von Ulcera, Behandlung von Verbrennungswunden, Hämostase in der Thoraxchirurgie, Hämostase bei Leber- und Milzverletzungen, Hämostase bei Prostataktomien, Verklebung von Gefässnähten oder von Rupturen parenchymer Gewebe, die sich nur schwer vernähen lassen.

Das erfindungsgemäss hergestellte Kollagenprodukt kann vor der Applikation mit physiologisch wirksamen Stoffen, z.B. Antibiotika, Desinfektionsmitteln, Blutplasma, physiologischer Kochsalzlösung, Lokalanästhetika, etc., getränkt bzw. beladen werden.

B e i s p i e l . 1

1 kg Schweinehaut wurde bei -10 bis -20°C eingefroren und während 10-20 Minuten mit einem Messerhomogenisator hoher Tourenzahl sehr fein zerkleinert. Die Temperatur des Mahlgutes wurde durch Zugabe von Eisstückchen unter +40°C gehalten. Der erhaltene zähe fasrige Gewebepulver wurde in 5 Liter 10%iger NaCl-Lösung, die 2,5 g Natriumazid und 50 ml einer 10%igen wässrigen Lösung des nicht-ionischen Netzmittels NP 55/52 (Polyoxyäthylennonylphenyläther) enthielt, unter kräftigem Rühren suspendiert. Die Suspension wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt und anschliessend zentrifugiert. Der grau bis bräunlich gefärbte trübe Ueberstand, der Fett und unerwünschte wasserlösliche Ballaststoffe enthielt, wurde verworfen. Der zurückbleibende weisse Hautfaserpulver wurde noch zweimal in der gleichen Weise extrahiert, wobei der Extraktionsflüssigkeit pro Liter 0,1 Mol Dinatriumhydrogenphosphat zugesetzt wurde.

Der zurückbleibende Hautfaserpulver wurde in 3 Liter 3%iger Essigsäure aufgerührt und zentrifugiert. Das feste Zentrifugat wurde in 5 Liter 3%iger Essigsäure, die 1 g Pepsin und 5 ml Chloroform enthielt, suspendiert. Man liess die Suspension über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Die proteolytierte viskose farblose bis schwach milchige Kollagensuspension wurde durch ein feines rostfreies Drahtnetz am Vakuum abgenutscht.

Dem viskosen Filtrat wurde unter Rühren langsam gesättigte NaCl-Lösung (etwa 36%ig) zugegeben, bis der NaCl-Gehalt des Gemisches etwa 5% betrug. Dabei fiel das Kollagen als fasrig-flockiger weisser Niederschlag aus. Die restlichen Spuren von Pepsin wurden durch Behandlung des Niederschlages mit 500 ml 30%igem wässrigem NaOH während 2 Stunden inaktiviert.

Das Kollagen wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, in 5 Liter 3%iger Essigsäure bei pH 3-4 gelöst, durch Zugabe von gesättigter wässriger NaCl-Lösung gefällt und zentrifugiert. Diese Operation wurde noch zweimal wiederholt.

Der NaCl-haltige Kollagenrückstand wurde mit etwa 70%igem Aethylalkohol 1/2 Stunde lang aufgerührt. Das alkoholhaltige Gemisch wurde zentrifugiert. Diese Operationen wurden wiederholt, bis das abgeschiedene Kollagen einen NaCl-Gehalt von 0,006%, bezogen auf das Gewicht des Trockenrückstands, aufwies.

Das gereinigte und entsalzte Kollagen wurde in 3 Volumen 10%iger Essigsäure gelöst und mit destilliertem Wasser (etwa 2,5 bis 5-fache Volummenge) soweit verdünnt, dass die Kollagenkonzentration einen Trockenrückstand von 1% entsprach. Die viskose Kollagenlösung wurde durch eine G 1-Glassinternutsche filtriert, in kreisrunde Glasschalen abgefüllt und lyophilisiert. Die auf diese Weise erhaltenen scheibenförmigen, etwa 0,5 cm dicken Kollagenplatten wiesen eine filz- bzw. vliesartige Struktur auf. Die Kollagenplatten

wurden in Beutel aus Polyäthylenfolie verpackt, welche durch Verschweissen verschlossen wurden. Die verpackten Kollagenplatten wurden durch Bestrahlen mit einer Dosis von 2,5 Mrad γ -Strahlen sterilisiert.

B e i s p i e l 2

Der nach Beispiel 1 aus 1 kg Rindersehnen erhaltene, entfettete und extrahierte fasrige Gewebeprei wird in 5 Volumteilen 0,5-molarer Essigsäure suspendiert. Zu der Suspension wird 1 g technisches Pepsin, gelöst in 100 ml 0,01-n HCl gegeben, worauf das pH mit HCl auf 2,9 eingestellt wird. Unter wiederholtem Umrühren wird die Suspension 48 Stunden lang bei Raumtemperatur verdaut. Die erhaltene viskose Kollagensuspension wird durch eine Gl-Glasnutsche filtriert und so von unverdauten Rückständen befreit. Das Kollagen wird aus der Suspension zur Zugabe von 30%igem wässrigem NaOH gefällt und durch Zentrifugieren abgetrennt. Danach wird das Kollagen gereinigt, indem es in 0,5-molarer Essigsäure gelöst und durch langsame Zugabe von 3% NaCl wieder gefällt wird. Das gereinigte Kollagen wird in 0,5-molarer Essigsäure gelöst, mit Wasser verdünnt, worauf in einer Ultrafilterapparatur das im Kollagen noch enthaltene NaCl ausgewaschen wird. Die Ultrafiltration wird so lange durchgeführt, bis im Eluat mit Silbernitrat keine Chloridionen mehr nachweisbar sind und die Kollagenkonzentration 0,5% beträgt.

Die Kollagenlösung wird wie im Beispiel 1 feinfiltriert, lyophilisiert, verpackt und sterilisiert. Ausbeute: 102 g fasriges Kollagenvlies.

Patentansprüche

(1) Verfahren zur Herstellung eines sterilen Kollagenproduktes mit filz- bzw. vliesartiger Faserstruktur und offenen, kommunizierenden Hohlräumen zwischen den Fasern durch Entfettung von kollagenhaltigem Gewebe von Schlacht-
tieren, Extraktion des entfetteten Gewebes mit Elektrolyt-
lösungen zur Entfernung von nicht-kollagenen löslichen Ballast-
stoffen, Behandlung des erhaltenen Gewebes mit einem proteoly-
tischen, die Grundstruktur des Kollagens nicht angreifenden
Enzym zwecks Entfernung von nicht-kollagenen proteinartigen
Begleitsubstanzen und Telozeptiden, Reinigung des erhaltenen
Rohkollagens durch Umfällung, Entsalzung des gereinigten Kol-
lagens, Lösen des gereinigten und entsalzten Kollagens in einem
wässrigen Medium, Gefriertrocknen des Kollagens und Sterilisation
des getrockneten Kollagens, dadurch gekennzeichnet, dass man
das kollagenhaltige Gewebe bei 40°C nicht übersteigenden
Temperaturen sehr fein zerkleinert und die Entfettung und
die Entfernung der unerwünschten wasserlöslichen Ballast-
stoffe gleichzeitig durchführt, indem man den Gewebebrei
mit dem 5-fachen Volumen 5-15%iger wässriger NaCl-Lösung,
die 0,2-1‰ Natriumazid als Konservierungsmittel und ein
fettdispersierendes Netzmittel enthält, mehrmals extrahiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als kollagenhaltiges Gewebe von Schlachttieren Schweinehaut verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Entfernung der nicht-kollagenen proteinartigen Begleitsubstanzen und Telopeptide das entfettete und von wasserlöslichen Ballaststoffen befreite Gewebe mit etwa 3%iger wässriger Essigsäure, die Pepsin in einer Menge von etwa 1‰, bezogen auf das Gewicht des als Ausgangsmaterial verwendeten Gewebes, enthält, bei einem pH von etwa 2,5-3,5 behandelt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das durch Umfällung mit NaCl gereinigte Kollagen mit 60 bis 70%igem Äthylalkohol wäscht, bis der NaCl-Gehalt des Kollagens 0-0,9%, bezogen auf das Gewicht des Trockenrückstandes des Kollagenbreies, beträgt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man das gereinigte und entsalzte Kollagen in entmineralisiertem bzw. destilliertem Wasser, das bis zu etwa 3 Gew.% Essig- oder Ameisensäure enthält, löst, so dass die Konzentration der Lösung an Kollagen einem Trockenrück-

stand von etwa 0,5-2 Gew.% entspricht, und die erhaltene Lösung der Gefriertrocknung unterwirft.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Sterilisation durch Bestrahlung des bereits verpackten Kollagenproduktes mittels γ -Strahlen mit einer Dosis von 2-3,5 Mrad durchgeführt wird.

7. Steriles Kollagenprodukt, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1.

4/